

**Deteksi betanodavirus penyebab *viral nervous necrosis* (VNN) dengan metode *quantitative (real-time) reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-qPCR) menggunakan *hydrolysis probe***





© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip umum.....	2
4 Peralatan .....	2
5 Bahan .....	3
6 Prosedur .....	3
7 Interpretasi hasil .....	6
8 Jaminan mutu pengujian.....	8
Bibliografi .....	10





## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *betanodavirus* penyebab *viral nervous necrosis* (VNN) dengan metode *quantitative (real-time) reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 27 Agustus 2013 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER. 19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 8 November 2013 sampai dengan 6 Januari 2014 dengan hasil akhir RASNI.



**Deteksi *betanodavirus* penyebab *viral nervous necrosis* (VNN) dengan metode *quantitative (real-time) reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-qPCR) menggunakan *hydrolysis probe***

## 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *betanodavirus* penyebab *viral nervous necrosis* (VNN) pada ikan dengan metode *quantitative (real-time) reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

## 2 Istilah dan definisi

### 2.1

#### ***aliquot***

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

### 2.2

#### **amplifikasi**

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

### 2.3

#### ***annealing***

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

### 2.4

#### **denaturasi**

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

### 2.5

#### **ekstensi**

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

### 2.6

#### ***hydrolysis probe***

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

### 2.7

#### **kontrol negatif amplifikasi (*No Template Control*/NTC)**

kendali hasil reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa *nuclease-free water* yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan qPCR

### 2.8

#### **kontrol negatif ekstraksi (*Negative Extraction Control*/NEC)**

kendali hasil reaksi PCR dengan menggunakan hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water* untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi pada proses ekstraksi



2.9

**kontrol positif ekstraksi (*Positive Extraction Control/PEC*)**

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

2.10

***Limit of Detection (LOD)***

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

2.11

***primer***

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.12

***quantification cycle (Cq)/cycle threshold (Ct)/crossing point (Cp)***

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.13

***real-time PCR***

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.14

***Reverse Transcription (RT)/transkripsi balik***

proses pembentukan DNA komplemen dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.15

**standar positif**

plasmid yang mengandung cDNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

2.16

***template***

urutan DNA tertentu yang akan diamplifikasi

**3 Prinsip umum**

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan RNA dari organ/jaringan target yang diduga terinfeksi *betanodavirus*, dilanjutkan dengan transkripsi balik untuk mensintesis cDNA yang seterusnya mengamplifikasi secara *real-time*.

**4 Peralatan**

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- b) *centrifuge*;
- c) *dissecting set*;
- d) *freezer* (-20 °C atau yang lebih rendah);
- e) *heating block*;
- f) *laminar air flow cabinet*;
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- h) *minimixer*;



- i) 1 paket mesin *real-time* PCR;
- j) *rack ice block*;
- k) *spindown centrifuge*.

## 5 Bahan

- a) *cDNA Synthesis Kit*;
- b) etanol absolut p.a;
- c) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- d) kit ekstraksi RNA dengan metode *spin column*, atau larutan ekstraksi RNA komersial, *isopropanol* (*2-propanol*);
- e) *kit real-time* PCR komersial *compatible* dengan *TaqMan*<sup>®</sup> *probe*;
- f) *kloroform* ( $\text{CHCl}_3$ );
- g) larutan preservatif RNA;
- h) larutan *pembersih RNase*;
- i) *masker*;
- j) *nuclease free water*;
- k) plasmid kontrol positif *betanodavirus*;
- l) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- m) *RNase inhibitor*;
- n) sarung tangan (*powder-free*);
- o) 1 set primer spesifik dan *probe*
  - Primer *forward* : VNN RNA2 FOR : 5'-CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C-3'
  - Primer *reverse* : VNN RNA2 REV : 5'- CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C -3'
  - *Probe* : VNN RNA2 PROBE : 5'-FAM- TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG- CVG-BHQ1-3'
- p) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- q) tabung mikro atau *microplate PCR* optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl.

**CATATAN 1** bahan, primer dan probe mengacu pada metode OIE 2012

**CATATAN 2** bisa menggunakan primer dan *TaqMan*<sup>®</sup> *probe* lainnya yang sudah tervalidasi dan sudah diverifikasi di laboratorium

## 6 Prosedur

### 6.1 Persiapan contoh uji

- a. Telur dan larva (umur kurang dari 45 hari)  
Contoh uji diambil utuh.
- b. Juvenil (umur lebih dari 45 hari) sampai dewasa  
Contoh uji dapat diambil dari organ mata dan otak baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan preservatif RNA.

### 6.2 Ekstraksi RNA

#### 6.2.1 Metode presipitasi

- a) masukkan contoh uji sebanyak 20 mg ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml;
- b) tambahkan 500 µl *RNA extraction solution* ke dalam tabung mikro kemudian gerus sampai halus lalu diamkan pada 25 °C – 30 °C selama 5 menit;
- c) tambahkan 100 µl *kloroform* kemudian homogenkan selama 20 detik dan diamkan pada 25 °C – 30 °C selama 3 menit;



- d) sentrifugasi pada 14 000 x g selama 15 menit;
- e) pindahkan 200 µl supernatan ke dalam tabung mikro baru ukuran 1,5 ml dan tambahkan 200 µl isopropanol;
- f) homogenkan kemudian sentrifugasi pada 14 000 g selama 10 menit;
- g) buang supernatan dan cuci *pellet* dengan 500 µl etanol 75% lalu sentrifugasi pada 12 000 x g selama 5 menit;
- h) buang etanol lalu keringkan *pellet*;
- i) larutkan *pellet* dengan 200 µl *nuclease free water* atau buffer TE;
- j) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm ( $A_{260}$ );
- k) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- l) periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ );
- m) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

### 6.2.2 Metode *spin column*

- a) masukkan 20 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 400 µl *lysis/binding buffer* dan homogenkan;
- c) sentrifugasi pada kecepatan maksimal (13 000 x g) selama 2 menit dan ambil supernatan dan masukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml untuk proses selanjutnya;
- d) tambahkan 200 µl (0,5 volume) etanol absolut p.a dan campurkan;
- e) pasang *spin column* dengan *collection tube* dan masukkan seluruh campuran di atas (maksimal 700 µl) ke dalamnya;
- f) sentrifugasi pada kecepatan maksimal (13 000 x g) selama 30 detik;
- g) buang larutan hasil sentrifugasi dan pasang kembali *spin column* pada "*collection tube*";
- h) masukkan campuran 90 µl *DNase Incubation Buffer* (*white cap*) dan 10 µl larutan *Dnase I* ke dalam *spin column*;
- i) inkubasikan selama 15 menit pada 15 °C – 25 °C;
- j) tambahkan 500 µl *wash buffer I* (*black cap*) ke dalam bagian atas *spin column*;
- k) sentrifugasi pada 8 000 g selama 15 detik;
- l) buang larutan hasil sentrifugasi dan pasang kembali *spin column* pada "*collection tube*";
- m) ulangi langkah ke j - l menggunakan *wash buffer II* (*blue cap*);
- n) tambahkan 300 µl *wash buffer II* (*blue cap*) ke dalam *spin column*;
- o) sentrifugasi pada kecepatan maksimal selama 2 menit atau kurang lebih 13 000 g;
- p) pisahkan secara hati-hati *spin column* dari "*collection tube*";
- q) pasang *spin column* dengan tabung mikro steril 1,5 ml (*nuclease free*);
- r) tambahkan 100 µl *elution buffer* ke dalam *spin column*;
- s) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit;
- t) ukur konsentrasi dan kemurnian RNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ );
- u) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

**CATATAN 1** kedua prosedur di atas menggunakan kit komersial Lysis Buffer dan High Pure RNA Tissue Kit (Roche)

**CATATAN 2** ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial lainnya



### 6.3 Transkripsi balik dan amplifikasi

#### 6.3.1 Transkripsi balik

- panaskan RNA hasil ekstraksi (*template*) pada 100 °C selama 5 menit kemudian masukkan ke dalam es;
- buat preparasi campuran bahan untuk sintesis cDNA atau PCR *cocktail* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- distribusikan 10 µl *cocktail* tersebut pada tabung mikro ukuran 0,2 ml;
- masukkan 10 µl *template* RNA (10 ng - 100 ng) contoh uji;
- inkubasikan pada *thermal cycler* sebagai berikut : 10 menit 25 °C, 120 menit 37 °C dan 5 menit 85 °C;
- simpan cDNA pada -20 °C sampai digunakan.

**CATATAN 1** Protokol di atas menggunakan kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems

**CATATAN 2** Transkripsi balik juga dapat menggunakan kit komersial lainnya

**Tabel 1 – Komposisi *cocktail***

No	Nama Bahan	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
1	10X RT <i>buffer</i>	2,0	1X
2	25X dNTP mix (100 mM)	0,8	1X
3	10X RT <i>random primers</i>	2,0	1X
4	<i>Multiscribe reverse transcriptase</i>	1,0	-
5	<i>Nuclease free water</i>	4,2	-
Total		10	

#### 6.3.2 Proses amplifikasi

- cairkan cDNA, *primer*, *probe*, PCR *master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es;
- buat preparasi *cocktail* amplifikasi sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- homogenkan semua bahan *cocktail* amplifikasi dan distribusikan 15 µl ke masing-masing tabung atau *microplate* PCR optikal;
- masukkan 5 µl *template* cDNA contoh uji, kontrol negatif amplifikasi, kontrol negatif ekstraksi (NTC), kontrol positif ekstraksi; dan 5 standar positif ( $10^2$  *copies*,  $10^3$  *copies*,  $10^4$  *copies*,  $10^5$  *copies*, dan  $10^6$  *copies*). Lakukan amplifikasi dengan kondisi sesuai Tabel 3.

**Tabel 2 – Komposisi *cocktail* amplifikasi**

No	Nama Bahan	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	<i>Nuclease-free water</i>	7,7	
2	<i>Taq man master mix</i> 5 x	4	1 x
3	<i>Primer FOR</i> VNN RNA2 (20 µM)	0,9	0,9 µM
4	<i>Primer REV</i> VNN RNA2 (20 µM)	0,9	0,9 µM
5	<i>Probe PROBE</i> VNN RNA2 (10 µM)	1,5	0,75 µM
Total		15	

**CATATAN** komposisi *cocktail* disesuaikan dengan manual kit yang digunakan



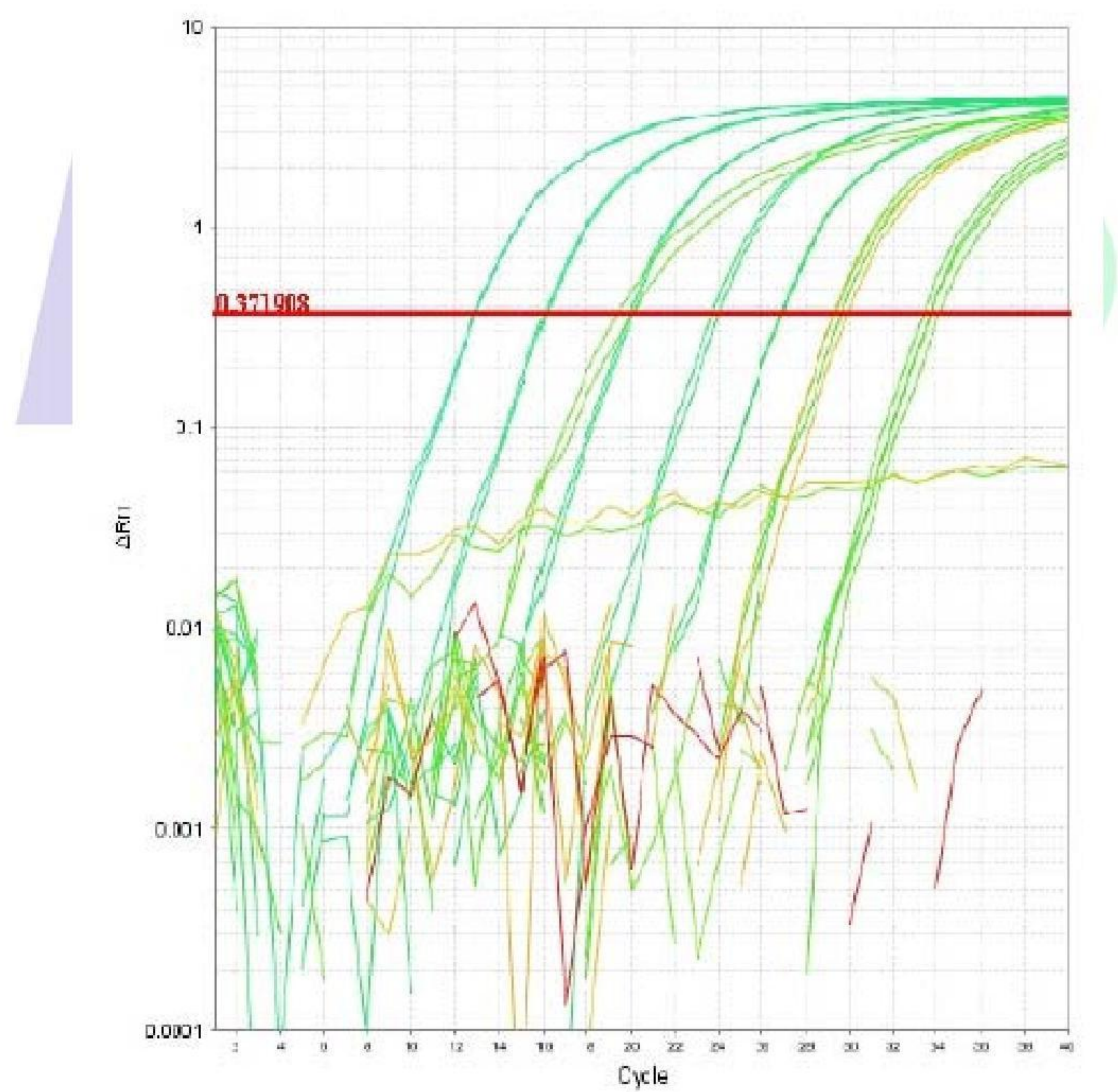
Tabel 3 - Program amplifikasi

Proses		Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Mode analisis
Hot Start		95	10 menit	-	-
Amplifikasi	Denaturasi	95	10 detik	45 x	Kuantifikasi
	Annealing	58	35 detik		
	Ekstensi	72	1 detik		
Cooling		40	30 detik	-	-
CATATAN program amplifikasi disesuaikan dengan manual kit dan mesin <i>real-time</i> PCR yang digunakan					

7 Interpretasi hasil

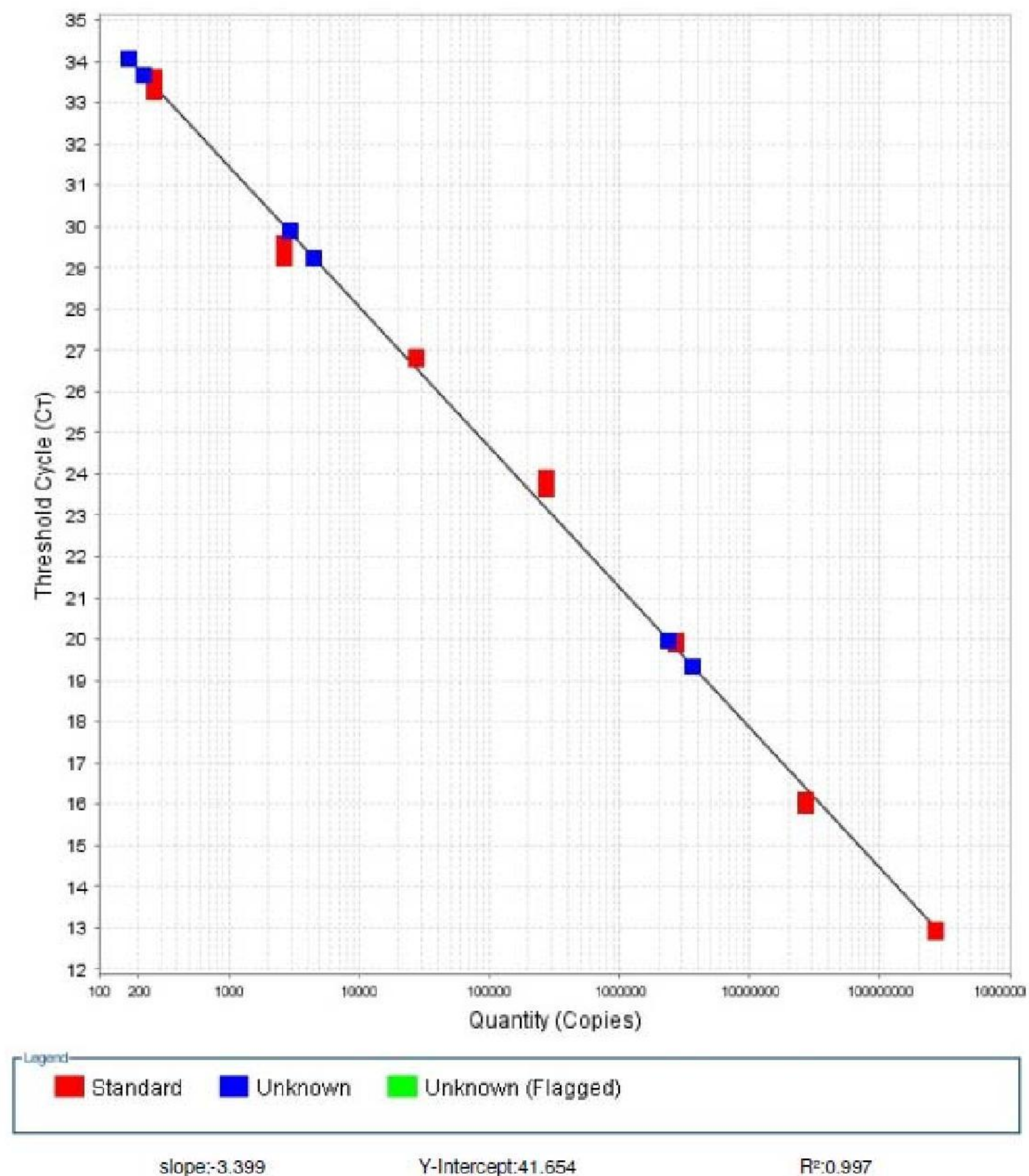
Lakukan analisis data sesuai dengan *software* mesin *real-time* PCR yang digunakan.

a) Pengamatan selama proses amplifikasi :



Gambar 1 – Contoh kurva amplifikasi





**Gambar 2 – Kurva standar dan contoh uji**

Interpretasi kurva *amplifikasi* adalah sebagai berikut:

- *threshold/cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada di atas perpotongan antara kontrol negatif amplifikasi dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan standar positif.
- contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai *Cq* lebih kecil atau sama dengan LOD.
- semakin cepat munculnya kurva dan memotong garis *threshold/cut off* menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin banyak
- contoh uji dinyatakan negatif apabila berada di bawah garis *threshold/cut off* dan nilai *Cq* lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

b) Kuantifikasi *copy* virus

Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan. Nilai positif akan terlihat dari nilai konsentrasi pada angka tertentu.



Tabel 4 – Contoh laporan hasil kuantifikasi *copy* virus

<i>Well</i>	<i>Contoh uji</i>	<i>Target</i>	<i>Task</i>	<i>Quantity</i>	<i>Quantification cycle (Cq)</i>
A1	1	VNN	Kontrol negatif amplifikasi	-	<i>Undetermined</i>
A2	1	VNN	Kontrol negatif amplifikasi	-	<i>Undetermined</i>
B1	2	VNN	Kontrol negatif ekstraksi	-	<i>Undetermined</i>
B2	2	VNN	Kontrol negatif ekstraksi	-	<i>Undetermined</i>
B3	3	VNN	Kontrol positif ekstraksi	2 889,67	29,88
B4	3	VNN	Kontrol positif ekstraksi	4 474,42	29,24
B5	4	VNN	Contoh uji 1	-	<i>Undetermined</i>
B6	4	VNN	Contoh uji 1	-	<i>Undetermined</i>
C1	5	VNN	Contoh uji 2	-	<i>Undetermined</i>
C2	5	VNN	Contoh uji 2	-	<i>Undetermined</i>
C5	7	VNN	Contoh uji 4	2 392 833	19,97
C6	7	VNN	Contoh uji 4	3 654 956	19,34
C7	8	VNN	Contoh uji 5	170,14	34,07
C8	8	VNN	Contoh uji 5	222,18	33,67
C9	Std1	VNN	Standar	100	33,28
C10	Std1	VNN	Standar	100	33,63
C11	Std2	VNN	Standar	1 000	29,21
C12	Std2	VNN	Standar	1 000	29,57
D1	Std3	VNN	Standar	10 000	26,83
D2	Std3	VNN	Standar	10 000	26,77
D3	Std4	VNN	Standar	100 000	23,66
D4	Std4	VNN	Standar	100 000	23,92
D5	Std5	VNN	Standar	1 000 000	19,96
D6	Std5	VNN	Standar	1 000 000	19,84
D7	Std6	VNN	Standar	10 000 000	16,08
D8	Std6	VNN	Standar	10 000 000	15,98
D9	Std7	VNN	Standar	100 000 000	12,95
D10	Std7	VNN	Standar	100 000 000	12,92

\* *Undetermined* : tidak terdeteksi

## 8 Jaminan mutu pengujian

- semua tahapan pengerjaan diawali dengan membersihkan meja kerja dan alat menggunakan larutan pemusnah RNase;
- proses ekstraksi RNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) atau dengan menggunakan *reference gen* dan menunjukkan hasil yang konsisten;
- hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio  $\bar{A}_{260}/\bar{A}_{280}$  berkisar 1,8 – 2,1;
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) serta menunjukkan hasil yang konsisten;
- efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai *slope* -3,10 sampai dengan -3,58;



- f) proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar yang nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) > 0,985;
- g) keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai Standar Deviasi (SD)  $C_q < 0,5$ ;
- h) apabila hasil  $C_q$  dari contoh uji mendekati nilai LOD, maka harus dilakukan pengujian amplifikasi kembali sebanyak tiga kali ulangan terhadap contoh uji yang sama. Hasil uji yang dominan akan dipakai untuk menentukan hasil positif atau negatif.





## Bibliografi

OIE. 2012. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.3.11.

Panzarin, V., P. Patarnello, A. Mori, E. Rampazzo, E. Cappellosza, G. Bovo and G. Cattoli. 2010. Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol* 155: 1193 – 1203.

